

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



F 5

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C07K 9/00, C07H 15/203, C07D 491/22, A61K 38/14, 31/70		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/51703  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. November 1998 (19.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02620 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Mai 1998 (04.05.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 20 043.5 14. Mai 1997 (14.05.97) DE 197 37 477.8 28. August 1997 (28.08.97) DE 198 01 037.0 14. Januar 1998 (14.01.98) DE 198 13 137.2 25. März 1998 (25.03.98) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Süderstrasse 3, D-51375 Leverkusen (DE). VON DEM BRUCH, Karsten [DE/DE]; Bonifatiusstrasse 2, D-51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, D-42115 Wuppertal (DE). SPERZEL, Michael [DE/DE]; Normannenstrasse 31, D-42275 Wuppertal (DE).  (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE- SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(54) Title: 20(S) CAMPTOTHECIN GLYCOCONJUGATES (54) Bezeichnung: GLYKOKONJUGATE VON 20(S)-CAMPTOTHECIN (57) Abstract <p>The invention relates to 20(S) camptothecin glycoconjugates, wherein a 3-O-methylated <math>\beta</math>-L-fucose element is bonded to the 20-hydroxyl group of a camptothecin derivative by means of a thiourea-modified peptide spacer. The invention also relates to a method for the production of the inventive compounds and to the use thereof as medicaments, specially in the field of cancer diseases.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Glykokonjugate von 20(S)-Camptothecin, in denen ein 3-O-methylierter <math>\beta</math>-L-Fucose-Baustein über einen Thiohamstoff-modifizierten Peptidspacer mit der 20-Hydroxylgruppe eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire			PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Glycokonjugate von 20(S)-Camptothecin

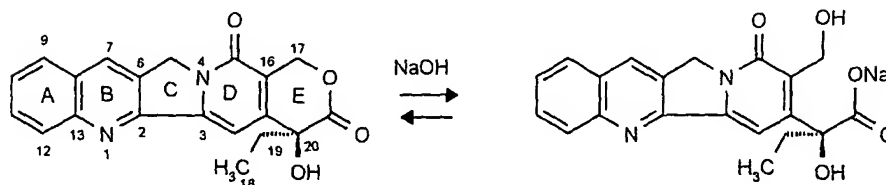
Die vorliegende Erfindung betrifft Glycokonjugate von 20(S)-Camptothecin, in denen ein 3-O-methylierter  $\beta$ -L-Fucose-Baustein über Thioharnstoff-modifizierte Peptid-spacer mit der 20-Hydroxylgruppe eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

10

20(S)-Camptothecin ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J.Am.Chem.Soc. 88, 3888 (1966)). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und Löslichkeitsproblemen.

20

Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.



Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzym-inhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in-vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

25

- 2 -

Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al. US 4943579). Letzteres Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani  
5 et al. WO 9602546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben allerdings in-vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

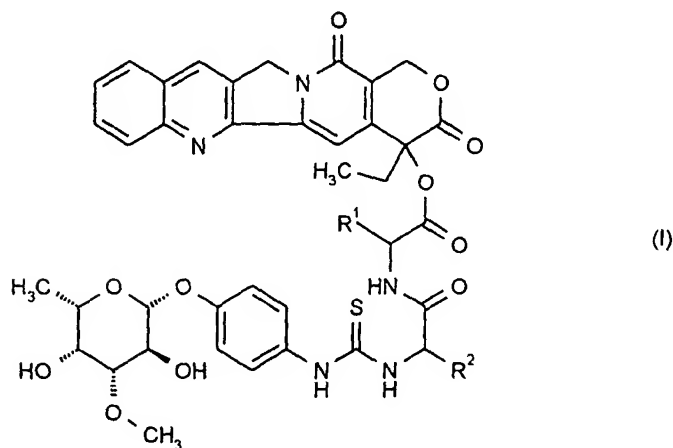
In WO 9631532 A1 wurden zuckermodifizierte Cytostatika beschrieben, bei denen die Verknüpfung von verschiedenen cytotoxischen oder cytostatisch aktiven Verbindungen mit z.B. regioselektiv modifizierten Kohlenhydratbausteinen über bestimmte  
10 Spacer zu einer Verbesserung der Tumorselektivität führte. Aus den dort breit beschriebenen Kombinationen von Kohlenhydrat, Spacer und Wirkstoff fanden wir nun überraschend, daß die Anknüpfung von in 3-Stellung modifizierten  $\beta$ -L-Fucosebausteinen über einen Thioharnstoff-modifizierten Peptid-Spacer, bestehend aus einer  
15 sterisch anspruchsvollen unpolaren und einer basischen Aminosäure an die 20-Hydroxyl-Gruppe von 20(S)-Camptothecin zu ganz besonders bevorzugten Konjugaten mit folgenden Eigenschaften führt:

- Durch die esterartige Anknüpfung des Carrier-Rests an die 20-Hydroxylgruppe wird der für die Wirkung wichtige Lactonring im Camptothecin-Teil stabilisiert.  
20
- Durch die spezielle Konstellation der Dipeptid-Spacer weisen die Konjugate in extrazellulärem Medium und in Blut eine im Vergleich zu ähnlichen, zuvor in WO 9631532 beschriebenen Konjugaten mit anderen Spacern nochmals  
25 deutlich verbesserte Stabilität auf. Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Konjugate stabiler als die in US 4943579 beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs von Camptothecin.
- Die erfindungsgemäßen Konjugate sind im Vergleich zu ähnlichen Konjugaten aus WO 9631532 besser wasserlöslich.  
30

- 3 -

- Die erfindungsgemäßen Konjugate zeigen in-vitro eine hohe Aktivität gegenüber Tumorzelllinien und Tumorexografts.
- 5 - Die erfindungsgemäßen Konjugate zeigen in-vivo nach i.v.-Applikation exzellente therapeutische Wirksamkeit über mehrere Dosisstufen gegenüber verschiedenen Tumoren.
- Sie weisen gegenüber dem zugrundeliegenden Toxophor eine deutlich höhere
- 10 Verträglichkeit und Tumorselektivität insbesondere im Hinblick auf Knochenmarktoxizität auf.

Die Erfindung betrifft Verbindungen der Formel (I)



worin

R<sup>1</sup> für eine sterisch anspruchsvolle unpolare Seitenkette einer Aminosäure steht  
und

R<sup>2</sup> für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht

sowie deren Salze, Stereoisomere und Stereoisomerengemische.

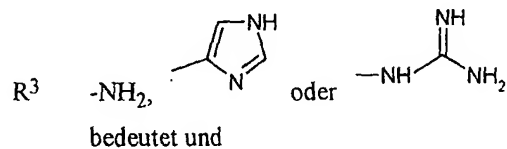
Bevorzugt sind Verbindungen der Formel (I),

5

worin

$R^1$  für einen verzweigten Alkylrest mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen steht und

10  $R^2$  für einen Rest der Formel  $-(CH_2)_n-R^3$  steht, wobei

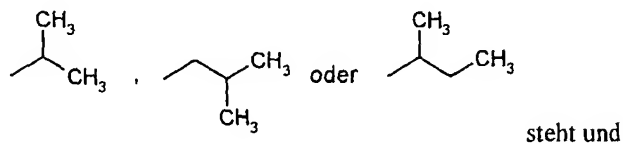


15  $n$  für eine Zahl 1 bis 4 steht.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin

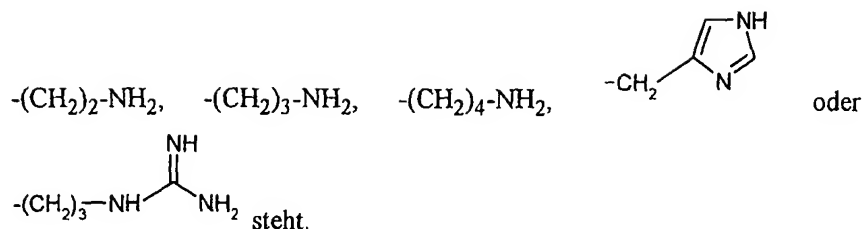
$R^1$  für einen verzweigten Alkylrest der Formeln

20



$R^2$  für einen Rest der Formeln

- 5 -



Der Camptothecin-Baustein kann in der 20(R)- oder in der 20(S)-Konfiguration oder  
 5 als Gemisch dieser beiden stereoisomeren Formen vorliegen. Bevorzugt ist die 20(S)-  
 Konfiguration.

Die Aminosäuren können in der L- oder in der D-Konfiguration auftreten oder auch  
 als Gemisch von D- und L-Form.

10

Der Begriff „Aminosäuren“ bezeichnet insbesondere die in der Natur vorkommenden  
 $\alpha$ -Aminosäuren, umfaßt darüber hinaus aber auch deren Homologe, Isomere und  
 Derivate. Als Beispiel für Isomere können Enantiomere genannt werden. Derivate  
 können beispielsweise mit Schutzgruppen versehene Aminosäuren sein.

15

Unter Aminosäuren mit „sterisch anspruchsvollen“ Seitenketten werden solche  
 Aminosäuren verstanden, deren Seitenkette in der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Position eine Verzwei-  
 gung aufweist; als Beispiele seien Valin und Isoleucin bzw. Leucin genannt.

20

Als typische Beispiele für Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten seien genannt:  
 Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Tryptophan, Phenylalanin, Methionin.

Als typische Beispiele für Aminosäure mit basischen Seitenketten seien genannt:  
 Lysin, Arginin, Histidin, Ornithin, Diaminobuttersäure.

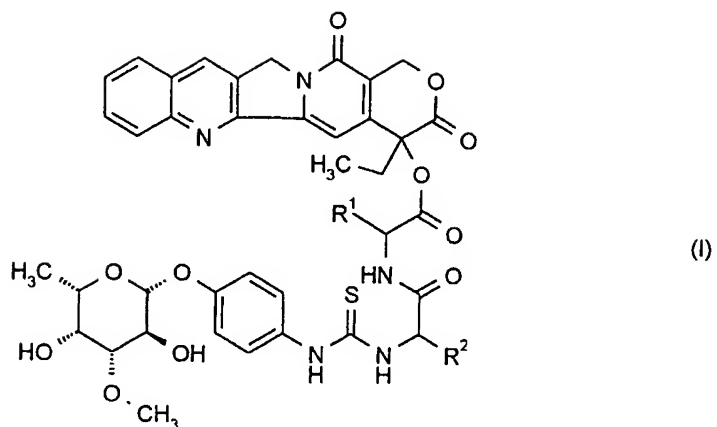
25

Die erfindungsgemäßen Verbindungen liegen bevorzugt in Form ihrer Salze vor. Im  
 allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Säuren genannt.

- Zu den Säuren, die addiert werden können, gehören vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z.B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie z.B.
- 5 Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalindisulfonsäure oder Camphersulfonsäure.
- 10 Die erfindungsgemäßen Glykokonjugate können beispielsweise hergestellt werden durch Verknüpfung von 20(S)-Camptothecin mit aktivierten Carboxylkomponenten, die ihrerseits Teile von geschützten Aminosäuren, Peptiden oder kohlenhydratmodifizierten Peptiden darstellen können.
- 15 Bevorzugt erfolgt der Aufbau des Glykokonjugats sequentiell, beginnend mit der Acylierung von 20(S)-Camptothecin mit einem N-geschützten carboxyl-aktivierten Baustein einer unpolaren sterisch anspruchsvollen Aminosäure in einem geeigneten Lösungsmittel, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, nach üblichen Methoden. Anschließend wird mittels bekannter Methoden selektiv die Aminoschutzgruppe
- 20 abgespalten. Dann wird ein falls notwendig geeignet geschützter Baustein einer basischen Aminosäure angeknüpft und anschließend gegebenenfalls unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppe an der  $\alpha$ -Aminofunktion deblockiert. Im Schlüsselschritt erfolgt die Verknüpfung mit dem Kohlenhydratrest durch Überführung von p-Aminophenyl-3-O-methyl- $\beta$ -L-fucopyranosid in das entsprechende Isothiocyanat und anschließende Verknüpfung mit der deblockierten  $\alpha$ -Aminogruppe des Peptidyl-
- 25 Camptothecins. Gegebenenfalls noch vorhandene Seitenkettenschutzgruppen werden abgelöst und die freie Aminogruppe wird gegebenenfalls in ein geeignetes Ammoniumsalz überführt.
- 30 Die Erfindung betrifft somit weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Glykokonjugate der Formel (I)



- 7 -



worin

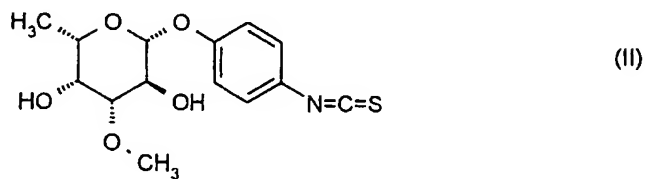
5

R<sup>1</sup> für eine sterisch anspruchsvolle unpolare Seitenkette einer Aminosäure steht und

R<sup>2</sup> für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht,

10

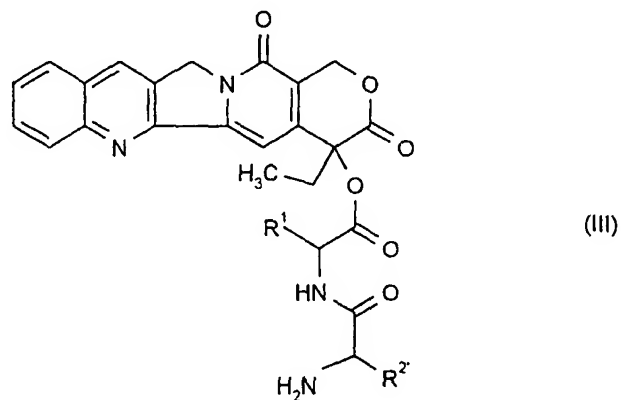
oder von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Isothiocyanat der Formel (II)



15

mit dem gegebenenfalls in der Seitenkette eine Schutzgruppe tragenden Peptidyl-Camptothecin der Formel (III)

- 8 -

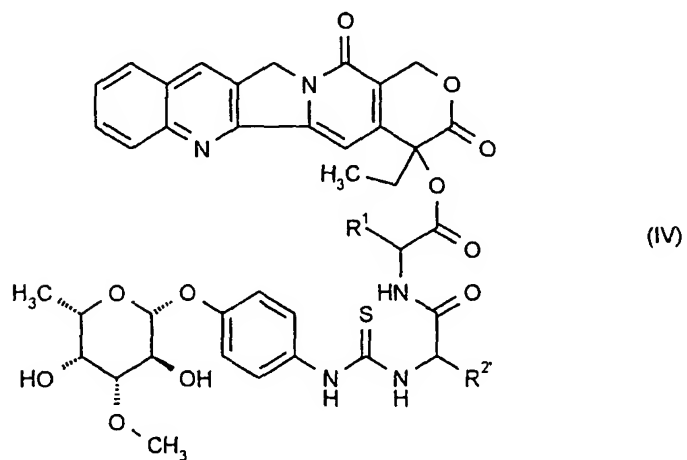


worin

5 R<sup>1</sup> die obengenannte Bedeutung hat und

R<sup>2</sup> die Bedeutung des obengenannten basischen Rests R<sup>2</sup> hat, der darüberhinaus  
 an der basischen Gruppe eine in der Peptidchemie übliche Schutzgruppe tragen  
 10 kann

zu dem Glykokonjugat der Formel (IV)



- 9 -

worin

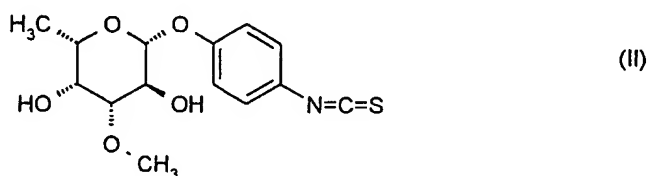
$R^1$  und  $R^{2'}$  die oben angegebenen Bedeutungen haben,

umsetzt,

die gegebenenfalls vorhandene Seitenketten-Aminoschutzgruppe nach üblichen Methoden abspaltet und die erhaltene Verbindung gegebenenfalls in das gewünschte Salz überführt.

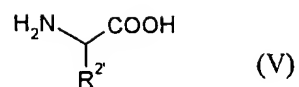
Denkbar ist auch eine andere Abfolge der Reaktionsschritte beim Aufbau der Zielverbindung. So kann gemäß einer ebenfalls bevorzugten Variante das p-Isothiocyanatophenyl-3-O-methyl- $\beta$ -L-fucosid auch zuerst mit der gegebenenfalls geeignet geschützten terminalen basischen Aminosäure verknüpft werden, und dieser Baustein anschließend mit der freien Aminogruppe des Aminosäurekonjugats aus 20(S)-Camptothecin und der unpolaren, sterisch anspruchsvollen Aminosäure umgesetzt werden. Gegebenenfalls vorhandene Seitenkettenschutzgruppen werden abgelöst und die freie Aminogruppe gegebenenfalls in ein geeignetes Ammoniumsalz überführt.

Die Erfindung betrifft daher weiterhin ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Isothiocyanat der Formel (II)



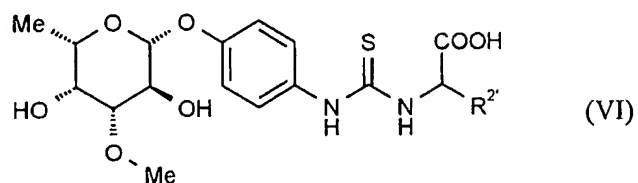
mit einer gegebenenfalls geeignet geschützten terminalen basischen Aminosäure der Formel (V)

- 10 -



5 worin  $\text{R}^2$  für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht, deren basische Gruppe geschützt sein kann,

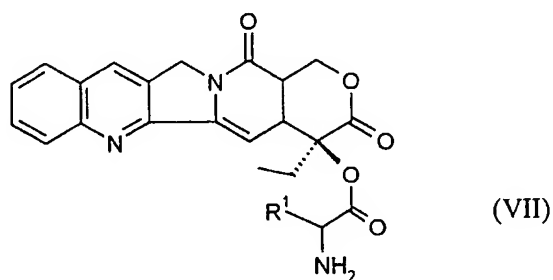
zu einem Aminosäurekonjugat der Formel (VI)



10

worin  $\text{R}^2$  die vorstehend angegebene Bedeutung hat, umsetzt,

diese dann mit Aminosäurekonjugaten der Formel (VII)



15

worin  $\text{R}^1$  die vorstehend angegebene Bedeutung hat,

umsetzt,

20

- 11 -

die Seitenkettenschutzgruppe abspaltet und die Verbindungen gegebenenfalls in ein geeignetes Salz überführt.

Insbesondere nach Anknüpfung der ersten Aminosäure an Camptothecin können  
5 Diastereomerengemische entstehen. Reine Diastereomere der erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich nach den oben angegebenen Verfahren beispielsweise herstellen, in dem man nach Anknüpfung des ersten Aminosäurebausteins an das Camptothecin und anschließender Schutzgruppenabspaltung die Diastereomere in geeigneter Weise trennt. Aus einer diastereomerenreinen Zwischenverbindung kann  
10 auf dem oben angegebenen Weg die diastereomerenreine Zielverbindung hergestellt werden.

Es kann auch das Diastereomerengemisch der Zielverbindung in üblicher Weise in die einzelnen Diastereomere aufgetrennt werden.

15 Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar, bzw. -30 bis +100°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten  
20 Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in DMF, Dichlormethan oder THF/Dichlormethan bei Raumtemperatur und Normaldruck bevorzugt.

Für die Aktivierung der Carboxylgruppen kommen die in der Peptidchemie bekannten  
25 Kupplungsreagenzien wie sie z.B. in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise N-Carbonsäureanhydride, Säurechloride oder gemischte Anhydride.

30 Weiterhin geeignet zur Aktivierung der Carboxylgruppen ist die Bildung von Addukten mit Carbodiimiden z.B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclo-

hexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Chlorameisensäureisobutylester, oder Benzotriazolyloxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol- oder N-Hydroxysuccinimidester. Weiterhin kann die Aminosäurekomponente auch in Form eines Leuchs'schen Anhydrids eingesetzt werden.

10

Als Basen können beispielsweise Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere eingesetzt werden.

15

Als Schutzgruppen für Drittfunktionen der Aminosäuren können die in der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen beispielsweise vom Urethan-, Alkyl-, Acyl-, Ester- oder Amid-Typ eingesetzt werden.

20

Aminoschutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptidchemie verwendeten Aminoschutzgruppen.

25

Hierzu gehören bevorzugt: Benzyloxycarbonyl, 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert-Butoxycarbonyl (Boc), Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, Phthaloyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, Menthyloxycarbonyl, 4-Nitrophenoxycarbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Trichloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 4-Nitro-

30

- 13 -

benzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugt sind die Fmoc-Gruppe und die Boc-Gruppe.

5 Bevorzugte Carboxylschutzgruppen sind lineare oder verzweigte C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkylester.

Die Abspaltung von Schutzgruppen in entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Base-Einwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reduktiv erfolgen.

10 Die erfindungsgemäßen Glycokonjugate weisen sowohl in-vitro als auch in-vivo eine überraschend starke Antitumor-Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumoren, insbesondere Lungen-, Brust-, Pankreas-, Melanom- und Dickdarm-Tumoren, verbunden mit einer großen Selektivität gegenüber nicht-malignen Zellen auf.

15 Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krebserkrankungen und zwar sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin.

20 Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben nicht-toxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen enthalten oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

25 Die Wirkstoffe können gegebenenfalls in einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

30

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer der erfindungsgemäßen Verbindung auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

5 Im allgemeinen hat es sich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen, den erfindungsgemäßen Wirkstoff in Gesamtmengen von etwa 0,5 bis etwa 500, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vorzugsweise in Mengen von etwa 1 bis etwa 80, insbesondere 3 bis 30 mg/kg  
10 Körpergewicht.



## Biologische Testung

### 1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften:

5

10

15

20

Die humanen Dickdarmzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und HBT 38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B16F10 (CRL 6475) wurden in Rouxschalen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS gezogen. Anschließend wurde trypsinisiert und in RPMI plus 10 % FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml für SW 480 und HT 29 und 20.000 Zellen für B16F10 aufgenommen. 100 µl Zellsuspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt. Das Wachstum wurde nach Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem Mikrowell 25 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinbromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H<sub>2</sub>O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min Schütteln mit 100 µl H<sub>2</sub>O wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem Multiplate Reader (Bio...) 3550-UV gemessen.

Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC<sub>50</sub>-Wert jeweils für die SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

**Tabelle 1:**

Beispiel	IC <sub>50</sub> / nM SW 480	IC <sub>50</sub> / nM HT 29	IC <sub>50</sub> / nM B16F10
20(S)-Camptothecin	10	5	20
Beispiel 1	70	40	200
Beispiel 2	100	40	300
Beispiel 3	100	20	500
Beispiel 4	100	20	500
Beispiel 5	80	50	200
Beispiel 6	60	30	300
Beispiel 7	80	30	20
Beispiel 8	200	100	800
Beispiel 9	200	70	400
Beispiel 10	100	50	300

2. **Hämatopoetische Aktivität des Glycokonjugats im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff:**

5

**Material und Methoden:**

Knochenmarkzellen wurden aus dem Femur der Maus gespült. 10<sup>5</sup>-Zellen wurden in McCoy 5A-Medium (0,3 % Agar) zusammen mit rekombinanten murinen GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10<sup>-4</sup> bis 100 µg/ml) bei 37°C und 7 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 7 Tage später wurden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

10

**Ergebnisse:**

Wie in Tab. 2 dargestellt, zeigen die untersuchten Glykokonjugate eine gegenüber dem zugrundeliegenden Wirkstoff drastisch verminderte Hemmung der Knochenmarkstammzellproliferation.

**Tabelle 2:**

Hemmung der CSF-induzierten Proliferation von Knochenmarkstammzellen der Maus

	IC <sub>50</sub> [ng/ml]
20(S)-Camptothecin	0,05
Beispiel 1	15
Beispiel 2	30
Beispiel 3	15
Beispiel 4	15
Beispiel 5	20
Beispiel 6	10
Beispiel 7	8
Beispiel 8	45
Beispiel 9	15
Beispiel 10	30

### 3. In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell

#### Material:

Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRI nu/nu-Stamm) verwendet. Das ausgewählte großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 wurde durch serielle Passage in Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

#### Experimenteller Aufbau:

Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde abhängig von der Verdopplungszeit gestartet, sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5-7 mm erreicht hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8 - 10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.

Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite / 2" berechnet ( $[a \times b^2] / 2$ , a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).

Die Werte des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumorgröße am Tag X mit der Tumorgröße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

Die Hemmung des Tumolvolumens (relatives Tumolvolumen der Testgruppe/Kontrollgruppe x 100, T/C in %) war der abschließende Meßwert.

**Behandlung:**

Die Applikation der Verbindungen erfolgte beispielsweise an Tag 0, 1 und 2 nach Randomisierung intravenös (i.v.), wobei die Gesamtdosis pro Tag über 2  
5 Gaben gesplittet wurde.

**Ergebnisse:**

Die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Glycokonjugate aus Beispiel 1 und 2 ist beispielhaft am großzelligen humanen Lungentumoxenograft LXFL 529 dargestellt. Die Therapie führt bei der maximal tolerablen  
10 Dosis (MTD) und bei 1/2 MTD zur kompletten bis deutlichen Tumoremision. Auch an anderen Tumoren kann eine exzellente Wirkung demonstriert werden.

**Tabelle 3:**

Therapie	Dosis [mg/kg/Tag]	Überlebens- zeit [Tage]	Zahl der Tumoren	opt. T/C [%]	relatives Körpergewicht an Tag 7 [% des Tages 0]
Kontrolle	-	7 >28 >28 >28 >28	8	100	104
Beispiel 1	16	>28 >28 >28 >28 >28	10	0 (Tag 28)	95
Beispiel 1	8	0 >28 >28 >28 >28	8	0 (Tag 14)	95
Beispiel 2	32	>28 >28 >28 20 1	8	0 (Tag 21)	98
Beispiel 2	16	>28 >28 >28 >28 >28	8	3,3 (Tag 28)	103

Die langanhaltende Komplettremission der Verbindung aus Beispiel 1 im Dosisbereich  
5 von 16 bis 8 mg/kg und die Dosisabhängigkeit der Wirkung ist in einem weiteren  
Experiment mit dem Therapieschedule Tag 1-3 i.v. in Fig. 1 dargestellt.

#### 4. Hydrolytische Stabilität:

Die erfindungsgemäßen Verbindungen aus Beispiel 1, 2, 8 und 9 werden in Wasser gelöst und zeigen nach 24h Stehen bei Raumtemperatur im HPLC deutlich unter 1%  
5 Camptothecin-Freisetzung nach Flächenprozent.

Bei Lösen von 10µM der Verbindungen aus Beispiel 1 und 2 in RPMI-Medium plus 10% FCS und in 30 %igem humanen Vollblut in PBS Puffer erfolgte nach 24 h Stehen nur eine Camptothecin-Freisetzung unter 5 %.

10

Methode:

HPLC System Hewlett Packard HP 1050

Säule: Nucleosil 120-5 C 18 250 mm x 4 mm (Macherey & Nagel; Germany)

Eluent: A: 0,01m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>= Milli-Pore grade)

15 B: 80% Acetonitril / 20% Eluent A

Fluß: 1,2ml

Gradient: t<sub>0</sub>: 20%B - t<sub>40</sub>: 100%B

t<sub>45</sub>: 100%B - t<sub>47</sub>: 20%B

Detektion: 240 nm oder 370 nm

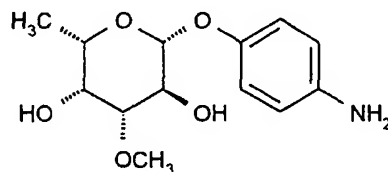
20

#### 5. Lacton-Stabilisierung:

Die erfindungsgemäßen Glycokonjugate aus den Beispielen 1, 2, 8 und 9 werden in 80% Wasser und 20% Acetonitril gelöst und mit 2 Äquivalenten Natronlauge auf pH  
25 9 eingestellt. Nach 1h Stehen bei Raumtemperatur liegt die Lactonring-Öffnung (Detektion nach obiger Methode) unter 5%.

BeispieleKohlenhydrat-Edukt:**I) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:**

5

**I.a) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:**

- 10 6 g (21 mmol) p-Nitrophenyl-β-L-fucopyranosid in 300 ml absol. Methanol werden mit 7,84 g (31,5 mmol) Dibutylzinnoxid versetzt und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird eingeeengt, der Rückstand getrocknet und dann in 300 ml DMF aufgenommen. Nach Zugabe von 15,7 ml Methyljodid wird der Ansatz 40 h bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 300 ml
- 15 Dichlormethan aufgenommen. Die Suspension wird filtriert, die verbleibende Lösung erneut eingeeengt und einer Flash-Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) unterzogen. Nach Einengen erhält man 3,82 g (61%) des Zielproduktes.

**I) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:**

20

3,81 g (12,73 mmol) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid werden in Methanol gelöst und nach Zusatz von Platindioxid in einer Wasserstoffatmosphäre bei geringem Überdruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Fällern mit Ether erhält man 3 g (88 %) des Zielproduktes. [DC: Dichlormethan/Methanol 9:1  $R_f$  = 0,53].

25



**Peptidyl-Camptothecin-Edukte:**

**II) 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:**

5

II) L 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

II) D 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

10

**II.a) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L/D-leucyl]-camptothecin:**

Eine Suspension von 10 g (28,7 mmol) 20(S)-Camptothecin in 250 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 11,1 g (43 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-leucin-N-carbonsäureanhydrid sowie 1 g 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 16 h Behandlung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur setzt man weitere 3,7 g N-(tert-Butoxycarbonyl)-leucin-N-carbonsäureanhydrid zu und beläßt weitere 2h bei Raumtemperatur. Anschließend wird von restlichem nicht gelösten Camptothecin abgetrennt und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird durch Flash-chromatographie [Petrolether/Ethylacetat 1:1 -> 1:4] gereinigt. Man erhält 13,55 g (84 %) der Zielverbindung II.a). [DC: Acetonitril R<sub>f</sub> = 0,47].

20

**II.b) 20(S)-20-O-L/D-Leucyl-camptothecin, Trifluoracetat:**

25 II. b) L 20(S)-20-O-L-Leucyl-camptothecin, Trifluoracetat

II. b) D 20(S)-20-O-D-Leucyl-camptothecin, Trifluoracetat:

Eine Lösung von Verbindung II.a (13,55 g, 24,1 mmol) in einer Mischung aus 100 ml Dichlormethan und 40 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das

30

- 24 -

Produkt mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Im Dünnschichtchromatogramm (Acetonitril/Wasser 20:1) erkennt man einen Doppelfleck mit  $R_f$ -Werten von 0,4 und 0,32 [Ausb.: 9,5 g (68 %)].

Durch mehrmaliges Fällern aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether kann das  
 5 Gemisch in beide Einzelkomponenten II.b) L und II.b) D aufgetrennt werden. Beide Formen erweisen sich als Diastereomere, die geringfügig unterschiedliche  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren ergeben:

polares Diastereomer:

400-MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1):  $\delta$  s C-H (B-Ring) 8,63 ppm  
 10 s C-H (D-Ring) 7,4 ppm

unpolares Diastereomer:

400-MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1):  $\delta$  s C-H (B-Ring) 8,60 ppm  
 s C-H (D-Ring) 7,32 ppm

15 In die weiteren Stufen können sowohl das Gemisch der beiden Formen als auch die aufgereinigten diastereomerenreinen Formen eingesetzt werden.

**II.c) 20(S)-20-O-[N $^\alpha$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^\epsilon$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L/D-leucyl]-camptothecin:**

20

II.c) L 20(S)-20-O-[N $^\alpha$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^\epsilon$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-leucyl]-camptothecin:

II.c) D 20(S)-20-O-[N $^\alpha$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^\epsilon$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-D-leucyl]-camptothecin:

25

25,6 g (54,6 mmol) N $^\alpha$ -(tert-Butoxycarbonyl)-N $^\epsilon$ -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-leucyl und 11,1 g (82 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 500 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 12,6 g (1,2 Äq.) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man Verbindung II.b (26,2 g, 0,83 Äq.) und 7,83 ml (1 Äq.) Ethyl-di-

30

- 25 -

isopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 1:2 -> Ethylacetat] erhält man die Zielverbindung (43,5 g, 87 %) [DC: Acetonitril  $R_f$  = 0,44].

- 5 Wie auch in den weiteren Beispielen kann der Ansatz völlig analog auch mit jeder der aufgereinigten diastereomerenreinen Formen in II.b durchgeführt werden.

**II) 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:**

10

II) L 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

II) D 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

15

Die Verbindung II.c (43,3 g, 47,5 mmol) wird in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Die resultierende Lösung wird für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen auf ein kleines Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Man erhält

20 39,4 g (90 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser 10:1  $R_f$  = 0,35].

**III) 20(S)-20-O-(L-Histidyl-L/D-valyl)-camptothecin, Trifluoracetat:****III.a) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L/D-valyl]-camptothecin:**

5 Eine Suspension von 10 g (28,7 mmol) 20(S)-Camptothecin in 500 ml absolutem Dimethylformamid wird unter Rühren mit 21,5 g (3 Äquivalenten) N-(tert-Butoxycarbonyl)-valin-N-carbonsäureanhydrid sowie 1 g 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 16 h Behandlung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur wird von restlichem nicht gelösten Camptothecin abgetrennt und das Filtrat im Vakuum eingeeengt.

10 Der Rückstand wird durch Flashchromatographie [Petrolether/Ethylacetat 1:3 -> Ethylacetat] gereinigt. Man erhält 11,65 g (73 %) der Zielverbindung. [DC: Acetonitril  $R_f = 0,44$ ]. Wird die gleiche Reaktion statt in Dimethylformamid in Dichlormethan unter Rückflußbedingungen durchgeführt, so wird die Entstehung des Diastereomers mit L-Konfiguration des Valin-Bausteins stärker begünstigt.

15

**III.b) 20(S)-20-O-L/D-Valyl-camptothecin, Trifluoracetat:**

III.b) L 20(S)-20-O-L-Valyl-camptothecin, Trifluoracetat

III.b) D 20(S)-20-O-D-Valyl-camptothecin, Trifluoracetat

20

Eine Lösung von Verbindung III.a (11,65 g, 21 mmol) in einer Mischung aus 100 ml Dichlormethan und 100 ml wasserfreier Trifluoressigsäure wird für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Das

25 Produkt wird nochmals aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt und als Gemisch von diastereomeren Formen isoliert. Ausb.: 10,9 g (92 %) [DC: Acetonitril/Wasser 20:1  $R_f = 0,31$  und  $0,39$ ]. Eine höhere Aufreinigung des unpolaren Diastereomers mit L-Konfiguration des Valin-Bausteins ist auf dieser Stufe durch Kristallisation aus Methanol möglich:

30 8g des erhaltenen Produkts mit angereichertem unpolarem Diastereomers werden in 80ml Methanol gelöst, auf 0°C abgekühlt und in 10ml Schritten mit Diethylether

versetzt. Nach Zugabe von insgesamt 60 ml Diethylether wird das ausgefallene Produkt abgesaugt und getrocknet. Man erhält 4,6g (58%) an reinem unpolarem Diastereomer mit L-Konfiguration des Valin-Bausteins. Eine Nachfällung der Mutterlauge mit Diethylether ergibt weitere 730mg (9%) einer Produktfraktion mit einem  
5 Diastereomerenverhältnis von 1:18.

In die weiteren Reaktionen kann sowohl das Diastereomergemisch als auch das aufgereinigte unpolare oder das polare Diastereomer eingesetzt werden. Die Umsetzungen laufen völlig analog.

10

**III.c) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidyl-L/D-valyl]-  
camptothecin:**

III.c) L	20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidyl-L-valyl]-camptothecin
15 III.c) D	20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidyl-D-valyl]- camptothecin

5,95 g (23,3 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidin und 4,73 g 1-Hydroxy-1H benzotriazol Hydrat werden in 200 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von  
20 5,38 g N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man Verbindung III.b (10,9 g, 19,44 mmol) und 6,7 ml Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie [Acetonitril/Wasser 50:1 -> 20:1] erhält man die Zielverbindung, [DC: Aceto-  
25 nitril/Wasser 10:1  $R_f = 0,42$ ] die sofort weiter umgesetzt wird.

**III) 20(S)-20-O-(L-Histidyl-L/D-valyl)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:**

III) L	20(S)-20-O-(L-Histidyl-L-valyl)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat
30 III) D	20(S)-20-O-(L-Histidyl-D-valyl)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat

Die Verbindung III.c wird in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Die resultierende Lösung wird für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen auf ein kleines Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Man erhält 13,05 g (83 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f = 0,2$ ].

**IV) 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-D-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:**

10 IV) L 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-D-lysyl-L-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

IV) D 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-D-lysyl-D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

15 Die Synthese dieser Verbindung erfolgt in völliger Analogie zu der diastereomeren Verbindung II. In der Stufe II.c wird anstelle von N<sup>α</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-N<sup>E</sup>-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysin das entsprechende D-Isomer eingesetzt [DC: Acetonitril/Wasser 10:1  $R_f = 0,4$ ].

20 **V) 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-ornithyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat:**

V) L 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-ornithyl-L-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

25 V) D 20(S)-20-O-{N<sup>E</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-ornithyl-D-leucyl}-camptothecin, Trifluoracetat

Die Synthese dieser Verbindung erfolgt in völliger Analogie zu der entsprechenden Lysin-Verbindung II. In der Stufe II.c wird anstelle von N<sup>α</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-

- 29 -

N<sup>ε</sup>-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysine N<sup>α</sup>-(tert-Butoxycarbonyl)-N<sup>ε</sup>-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-ornithine eingesetzt. [DC: Acetonitril/Wasser 20:1 R<sub>f</sub> = 0,125].

**VI) 20(S)-20-O-(L-Arginyl-L/D-leucyl)-camptothecin, Tri-Trifluoracetat:**

5

VI) L 20(S)-20-O-{L-Arginyl-L-leucyl}-camptothecin, Tri-Trifluoracetat

VI) D 20(S)-20-O-{L-Arginyl-D-leucyl}-camptothecin, Tri-Trifluoracetat

**VI.a) 20(S)-20-O-(Tri-tert-butoxycarbonyl-L-arginyl-L/D-leucyl)-camptothecin**

10

VI.a) L 20(S)-20-O-{Tri-tert-butoxycarbonyl-L-arginyl-L-leucyl}-  
camptothecin

VI.a) D 20(S)-20-O-{Tri-tert-butoxycarbonyl-L-arginyl-D-leucyl}-  
camptothecin

15

200 mg (0,42 mmol) Tri-tert-butoxycarbonyl-L-arginin und 80 mg 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 97 mg N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend setzt man Verbindung II.b (200 mg, 0,35 mmol) und 217 µl Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 3 d bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum und Behandeln mit Wasser erhält man die Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser 5:1:0,2 R<sub>f</sub> = 0,77] die sofort weiter umgesetzt wird.

20

**VI) 20(S)-20-O-{L-Arginyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Tri-Trifluoracetat**

25

VI) L 20(S)-20-O-{L-Arginyl-L-leucyl}-camptothecin, Tri-Trifluoracetat

VI) D 20(S)-20-O-{L-Arginyl-D-leucyl}-camptothecin, Tri-Trifluoracetat

30

0,35 mmol der Verbindung aus VI.a) werden in 10 ml Dichlormethan mit 5 ml wasserfreier Trifluoressigsäure für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein und

fällt zweimal aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether um. Man erhält 280 mg (82%) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser 10:3:1,5  $R_f = 0,42$ ].

5 VII) L 20(S)-20-O-{N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-valyl}-  
camptothecin, Trifluoracetat

VII.a) L 20(S)-20-O-[N<sup>α</sup>-(tert-butoxycarbonyl)-N<sup>ε</sup>-(fluorenyl-9-methoxycar-  
bonyl)-L-lysyl-L-valyl]-camptothecin

10 10,02 g (21,4 mmol) N -(tert-butoxycarbonyl)-N -(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-  
lysine und 4,4g (32,1 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 400 ml  
Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 4,92 g (1,2Äq.) N-Ethyl-N'-(dimethyl-  
aminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid rührt man für 30 min bei 0°C. Anschließend  
15 setzt man 10g (17,8 mmol) des unpolaren Diastereomers III.b L von Verbindung III.b  
und 9,2 ml (3Äq.) Ethyl-diisopropylamin zu und rührt den Ansatz für weitere 16 h bei  
Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum wird der Rückstand 30 min mit 500ml  
Wasser verrührt und abgesaugt. Das Produkt wird in 400 ml Dichlormethan aufge-  
nommen, das restliche Wasser entfernt, die Lösung auf 200ml aufkonzentriert und  
dann mit 800 ml Diethylether gefällt. Man saugt ab und wäscht den Rückstand mit  
20 Diethylether. Man erhält 14,712 g der Zielverbindung (92 %) [DC: Acetonitril  $R_f =$   
0,6].

VII) L 20(S)-20-O-{N-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-valyl}-  
camptothecin, Trifluoracetat

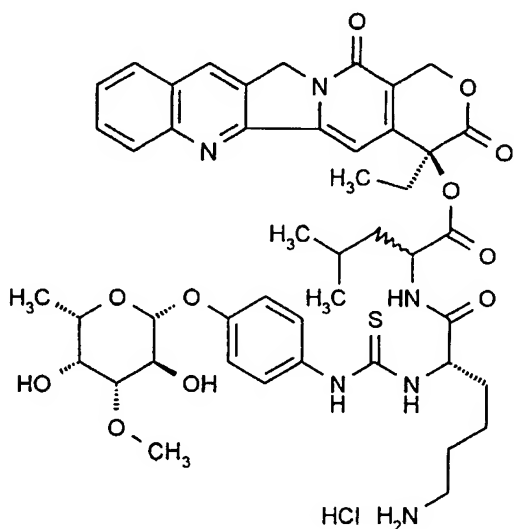
25 Die Verbindung VII.a) L (14,65 g, 16,3 mmol) wird in 300 ml Dichlormethan aufge-  
nommen und bei 0°C mit 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Die resultie-  
rende Lösung für 2 h unter Eiskühlung gerührt. Nach Einengen auf ein kleines  
Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe von Diethylether ausgefällt.  
30 Man erhält 13,8g (93%) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser 10:1  $R_f = 0,35$ ].



**Beispiel 1:**

**20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Hydrochlorid:**

5



**1.a) 20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxyphenyl-amino-thiocarbonyl]-N<sup>ε</sup>-[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin:**

10

Eine Lösung von 9,82 g (36,5 mmol) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid (Beispiel I) in 500 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird unter Rühren mit 3,94 ml Thiophosgen (1,4 Äq.) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 4 Äquivalenten Ethyldiisopropylamin, engt anschließend im Vakuum ein und trocknet den Rückstand für 1 h im Ölpumpenvakuum. Das erhaltene Isothiocyanat wird in 500 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und mit 30,4 g (32,8 mmol) von Verbindung II sowie 22,6 ml Ethyldiisopropylamin versetzt. Man rührt für 16 h bei Raumtemperatur, engt dann im Vakuum ein und verrührt mit Wasser. Den Rückstand reinigt man durch Flash-Chromatographie [Acetonitril -> Acetonitril/Wasser 30:1]. Das Produkt wird aus

15

20

Dichlormethan/Methanol mit Diethylether umgefällt und mit Diethylether gewaschen. Man erhält 28,7 g (78 %) des Zielproduktes [DC: Acetonitril/Wasser 10:1  $R_f$  = 0,44].

5      **1.b)    20-O-{N $\alpha$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin:**

28,6 g (25,5 mmol) des Konjugats 1.a) werden in 200 ml Dimethylformamid mit 5 ml Piperidin versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur engt man ein und digeriert den Rückstand zweimal mit Dichlormethan und setzt Diethylether zu. Dann wird in  
10    Dimethylformamid/Dichlormethan aufgenommen und mit Ether gefällt. Dieser Reinigungsprozess wird zweimal wiederholt. Das Produkt wird abgesaugt und mit Ether gewaschen. Ausb.: 19,5 g (85%) [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f$  = 0,3].

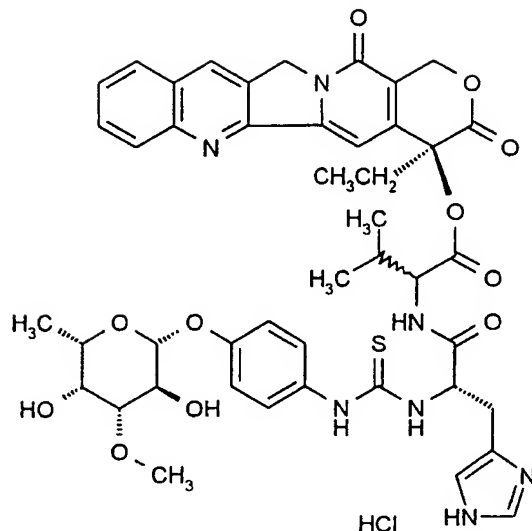
15      **1)      20(S)-20-O-{N $\alpha$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenyl-amino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L/D-leucyl}-camptothecin, Hydrochlorid:**

10 g (11,1 mmol) der Verbindung aus Beispiel 1.b werden in 100 ml Wasser aufgenommen, mit 11,1 ml (1 Äq.) einer 1N HCl-Lösung versetzt und lyophilisiert. Anschließend wird das Produkt mehrmals aus Dichlormethan/Methanol mit Diethyl-  
20    ether gefällt. Ausb.: 9,15 g (88%) [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f$  = 0,3].

**Beispiel 2:**

25      **20(S)-20-O-{N-[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-histidyl-L/D-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid:**

- 33 -

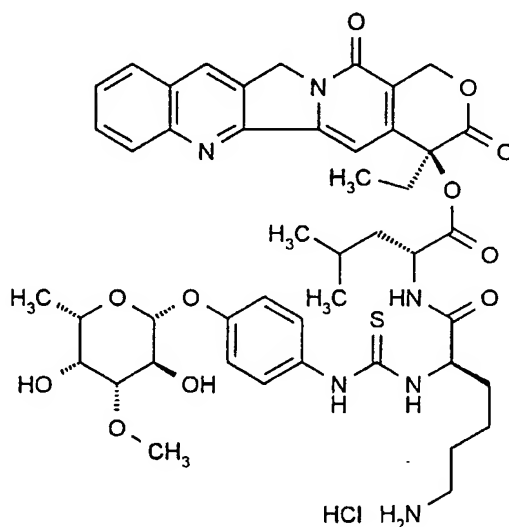


- Eine Lösung von 7,14 g (26,5 mmol) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid (Kohlenhydrat-Edukt I) in 300 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird unter Rühren mit 2,86 ml
- 5 Thiophosgen (1,4 Äq.) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 4 Äquivalenten Ethyl-diisopropylamin, engt anschließend im Vakuum ein und trocknet den Rückstand für 1 h im Ölpumpenvakuum. Das erhaltene Isothiocyanat wird in 500 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und mit 17,45 g (22 mmol) von Verbindung III sowie 22,7 ml Ethyl-diisopropylamin versetzt. Man rührt für 16 h bei Raumtemperatur, engt
- 10 dann im Vakuum ein und nimmt den Rückstand in Wasser auf. Man stellt mit 1N wäßriger Natronlauge auf pH 7,8 ein und saugt ab. Der Rückstand wird nach Trocknung im Hochvakuum zweimal aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether umgefällt und mit Diethylether gewaschen. Man erhält 17,97 g (91 %) des Zielproduktes, das anschließend mit 1 Äquivalent 0,1N wäßriger Salzsäure in das
- 15 Hydrochlorid überführt wird [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f = 0,36$ ] [FAB-MS:  $m/z = 896 (M + H^+)$ ].

**Beispiel 3:**

20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-D-lysyl-D-leucyl}-camptothecin, Hydrochlorid;

5



Die Synthese erfolgt völlig analog zu Beispiel 1. Hierbei wird von den Edukten I und IV.D ausgegangen, wobei ab der Stufe des 20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das polare Diastereomer II.b) D eingesetzt wurde. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R<sub>f</sub> = 0,31] [FAB-MS: m/z = 901 = M + H<sup>+</sup>]

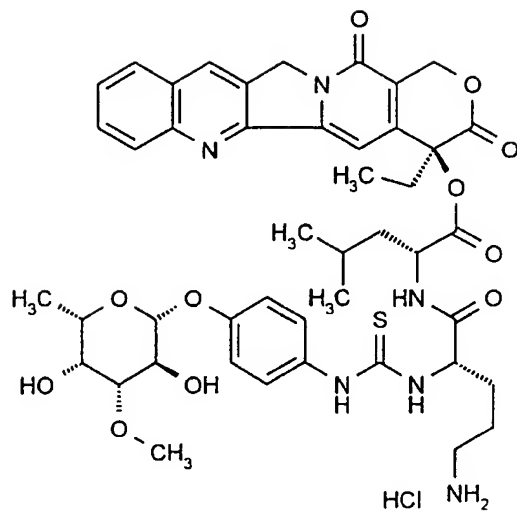
10

**Beispiel 4:**

20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-ornithyl-D-leucyl}-camptothecin, Hydrochlorid;

15

- 35 -



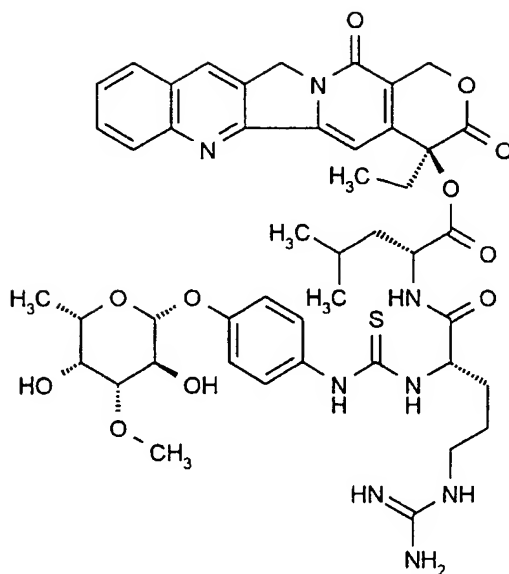
Die Synthese erfolgt völlig analog zu Beispiel 1. Hierbei wird von den Edukten I und V) D ausgegangen, wobei ab der Stufe des 20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das polare Diasteromer II.b) D mit D-Leu-Konfiguration eingesetzt wurde. [DC: 5  
Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f = 0,25$ ].

#### **Beispiel 5:**

10

**20(S)-20-O-[N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-arginyl-D-leucyl]-camptothecin;**

- 36 -

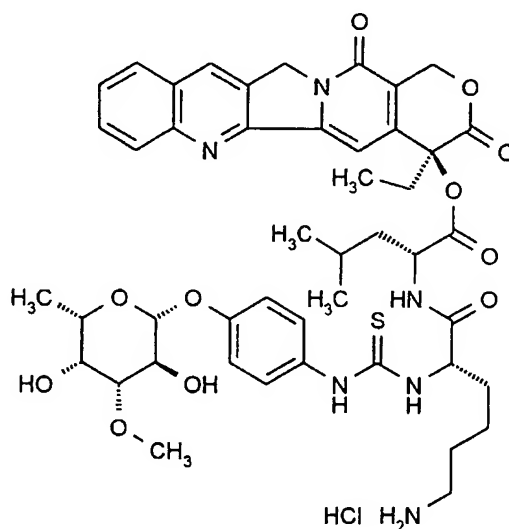


- Eine Lösung von 73 mg (0,27 mmol) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid (Edukt I) in 20 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird unter Rühren mit 30 µl Thiophosgen (1,4 Äq.) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 4 Äquivalenten Ethyldiisopropylamin, engt anschließend im Vakuum ein und trocknet den Rückstand für 1 h im Ölpumpenvakuum. Das erhaltene Isothiocyanat wird in 20 ml absolutem Dimethylformamid gelöst und mit 175 mg (0,18 mmol) von Verbindung VI) D sowie 620 µl Ethyldiisopropylamin versetzt. Zur Synthese von Verbindung VI) D wird hier ab der Stufe des 20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das polare Diastereomer II.b) D eingesetzt. Man rührt für 16 h bei Raumtemperatur, engt dann im Vakuum ein und verrührt mit Dichlormethan. Der Rückstand wird anschließend aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether umgefällt und mit Diethylether gewaschen. Man lyophilisiert anschließend aus Dioxan/Wasser und kristallisiert dann erneut aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether. Man erhält 154 mg (90 %) des Zielproduktes [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f = 0,39$ ] [FAB-MS:  $m/z = 929 = M+H^+$ ].

**Beispiel 6:**

**20(S)-20-O-[N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-D-leucyl]-camptothecin, Hydrochlorid;**

5



Die Verbindung wird in Analogie zu Beispiel 1 hergestellt, wobei auf der Stufe des  
20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das polare Diastereomer II.b) D mit D-Leucin-  
10 Konfiguration eingesetzt wurde.

Alternativ kann die Verbindung aus Beispiel 1 z.B. auch durch präparative HPLC in  
die einzelnen isomeren Formen aufgetrennt werden.

15 Bedingungen:

Trennsäule: Macherey & Nagel 250 x 21 mm Nucleosil 100-7 C18 AB

Laufmittel A: H<sub>2</sub>O + 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Laufmittel B: Acetonitril / Wasser 4:1 + 0,02M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Fluß: 10 ml/min

20 Inj.-Volumen: 1500µl

Gradient: 0-30 % B

- 38 -

4-30

20-90

22-90

24-30

5 Wellenlänge: 215 nm

Nach der HPLC-Trennung werden die entsprechenden Fraktionen lyophilisiert und der Rückstand dann mehrmals aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt. Anschließend stellt man auf pH 8-9 ein, filtriert ab und überführt den Rückstand mit  
10 0,1N Salzsäure in das Hydrochlorid.

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigen die Isomeren in Beispiel 6 und 7 unterschiedliche chemische Verschiebungen insbesondere für die beiden Singulets der aromatischen H-Atome im Camptothecin-B-Ring bzw. D-Ring.

15

Diastereomer mit D-Leucin:

400-MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1):  $\delta$  s C-H (B-Ring) 8,52 ppm

s C-H (D-Ring) 7,42 ppm

[FAB-MS:  $m/z = 901 = M + \text{H}^+$ ]

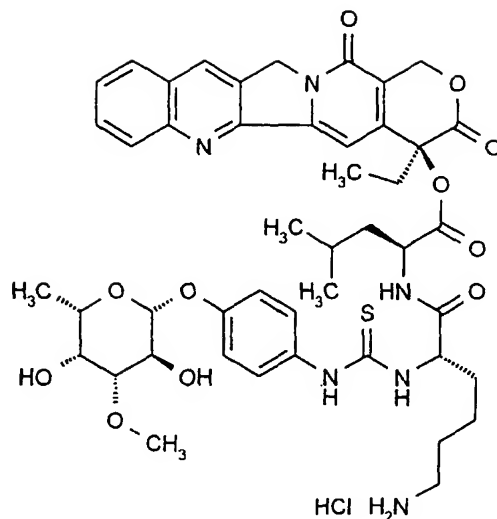
20

**Beispiel 7:**

20(S)-20-O-{N $^\alpha$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-  
25 thiocarbonyl]-L-lysyl-L-leucyl}-camptothecin, Hydrochlorid;



- 39 -



Die Verbindung wird in Analogie zu Beispiel 1 hergestellt, wobei auf der Stufe des 20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das unpolare Diastereomer II.b) L mit L-Konfiguration des Leucins eingesetzt wurde.

Alternativ kann die Verbindung aus Beispiel 1 z.B. auch durch präparative HPLC in die einzelnen isomeren Formen aufgetrennt werden.

Bedingungen: wie in Beispiel 6 angegeben

Nach der HPLC-Trennung werden die entsprechenden Fraktionen lyophilisiert und der Rückstand dann mehrmals aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt. Anschließend stellt man auf pH 8-9 ein, filtriert ab und überführt den Rückstand mit 0,1 N Salzsäure in das Hydrochlorid.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigen die Isomeren in Beispiel 6 und 7 unterschiedliche chemische Verschiebungen insbesondere z.B. für die beiden Singulets der aromatischen H-Atome im Camptothecin-B-Ring bzw. D-Ring.

- 40 -

Diastereomer mit L-Leucin:

400-MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1):  $\delta$  s C-H (B-Ring) 8,6 ppm  
 s C-H (D-Ring) 7,35 ppm

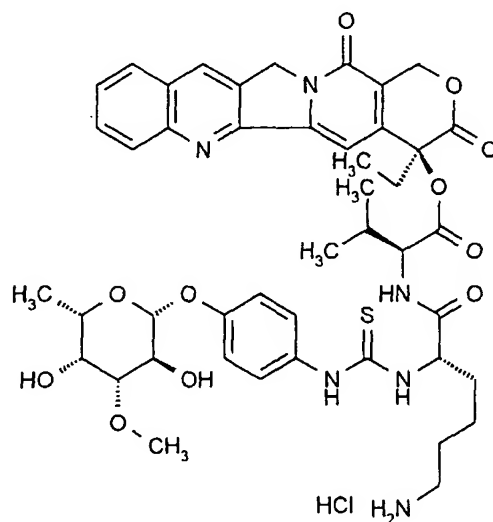
[FAB-MS:  $m/z = 901 = M + \text{H}^+$ ]

5

**Beispiel 8:**

20(S)-20-O- $\{N^\alpha$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino]-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid;

10



Die Verbindung wird in der unpolaren Serie ausgehend von der Verbindung VII) L in Analogie zu Beispiel 1 hergestellt.

15

Das Diastereomerenverhältnis kann durch analytische HPLC ermittelt werden. Gegebenenfalls durch Kristallisation aus Methanol kann eine weitere Aufreinigung des Diastereomers mit L-Konfiguration des Valins erreicht werden (>20:1).

HPLC-Bedingungen:

**Trennsäule:** Macherey & Nagel 250 x 4 mm Nucleosil 100-7 C18 AB

Laufmittel A:  $\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{M KH}_2\text{PO}_4$

**Laufmittel B:** Acetonitril / Wasser 4:1 + 0,02M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5 Fluß: 1 ml/min

Inj.-Volumen: 15 µl

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt das reine Diastereomer nur einen Signalsatz z.B. für die beiden Singulets der aromatischen H-Atome im Camptothecin-B-Ring bzw. D-Ring.

10	400-MHz- <sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /CD <sub>3</sub> OD 1:1):	δ	s C-H (B-Ring) 8,55 ppm
			s C-H (D-Ring) 7,35 ppm

[FAB-MS:  $m/z = 887 = M + H^+$ ]

15 Eine alternative Vorgehensweise beim Aufbau der Verbindung aus Beispiel 8 ist ebenfalls möglich. Dabei wird der Kohlenhydratbaustein aus Beispiel I zuerst mit einem seitenkettengeschützten Lysin-Derivat verknüpft:

**8a) N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxyphenylamino-thiocarbonyl]-N<sup>ε</sup>-[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]L-lysine**

20

Eine Lösung von 6,8 g (25,3 mmol) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid (Beispiel I) in 600 ml Dioxan/Wasser 1:1 wird unter Rühren mit 2,72 ml Thiophosgen (1,4 Äq.) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 26 ml Ethyldiisopropylamin, rührt weitere 5 min bei RT und engt anschließend im Vakuum auf ein Volumen von 150 ml ein. Man setzt 800 ml Dichlormethan zu und trennt die Phasen. Die organische Phase wird zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit 200 ml Methyl-tert.butylether und 200 ml Petrolether verrührt und abgesaugt. Man erhält 7,26 g (92 %) des Isothiocyanats.

30 2,92 g (9,4 mmol) des erhaltenen Isothiocyanats werden in 200 ml Dioxan/Wasser 1:1 gelöst und mit 3,11 g (0,9 Äq) von N<sup>ε</sup>-[Fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-lysin sowie

3,2 ml Ethyl-diisopropylamin versetzt. Man rührt für 16 h bei Raumtemperatur, engt dann im Vakuum ein und nimmt den Rückstand mit Wasser auf. Durch Einstellen des pH-Werts auf 2 mit 1 N HCl wird das Produkt ausgefällt und nach 30 min abgesaugt. Der Rückstand wird in Dichlormethan suspendiert und das Lösungsmittel zweimal  
5 abgezogen. Nach mehrmaligem Waschen mit Ether und Petrolether erhält man 5,3 g (92 %) Zielproduktes [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2  $R_f = 0,69$ ].

**8b) 20(S)-20-O-{N $^{\alpha}$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenyl-amino-thiocarbonyl]-N $^{\epsilon}$ -[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-valyl}-cam-  
10 ptothecin**

1,2 g (1,76 mmol) N $^{\alpha}$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-N $^{\epsilon}$ -[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysine (Beispiel 8a) und 675 mg (1,2 mmol) der Verbindung III.b) werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst, die  
15 Mischung auf 0°C abgekühlt und anschließend mit 346 mg (1,8 mmol) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid versetzt. Unter Rühren läßt man die Temperatur über Nacht auf RT ansteigen. Das Lösungsmittel wird i. vac. abgedampft und der Rückstand mit Wasser verrührt. Man reinigt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel, wobei man mit Acetonitril als Laufmittel startet und später auf Aceto-  
20 nitril/Wasser 50:1 übergeht. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen erhält man 1,06 g (76 %) des Zielprodukts [DC: Acetonitril/Wasser 20:1  $R_f = 0,34$ ].

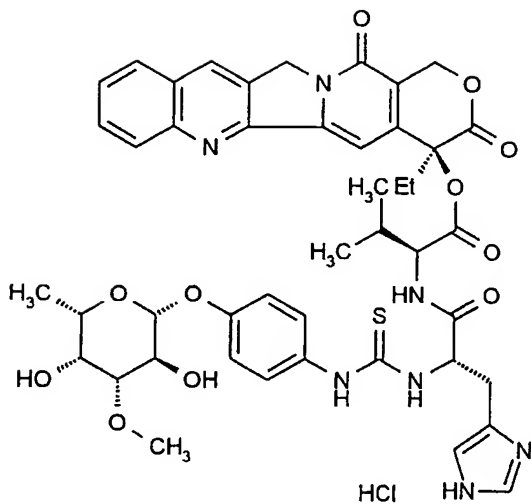
Die Deblockierung und die anschließende Überführung in das Hydrochlorid erfolgt in Analogie zu Beispiel 1.

25

**Beispiel 9:**

**20(S)-20-O-{N $^{\alpha}$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid,:**  
30

- 43 -



Die Verbindung wird ausgehend von dem unpolaren Diastereomer von 20-O-Valyl-Camptothecin, Trifluoracetat (III.b) L in Analogie zu Beispiel 2 hergestellt.

- 5 Das Diastereomerenverhältnis kann durch analytische HPLC ermittelt werden. Gegebenenfalls durch Kristallisation aus Methanol kann eine weitere Aufreinigung des unpolaren Diastereomers mit L-Konfiguration des Valins erreicht werden (>20:1)

HPLC-Bedingungen:

Trennsäule: Macherey & Nagel 250 x 4 mm Nucleosil 100-7 C18 AB

- 10 Laufmittel A:  $\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{M KH}_2\text{PO}_4$

Laufmittel B: Acetonitril / Wasser 4:1 + 0,02M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Fluß: 1 ml/min

Inj.-Volumen: 15  $\mu\text{l}$

- 15 Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt das reine Diastereomer nur einen Signalsatz z.B. für die beiden Singulets der aromatischen H-Atome im Camptothecin-B-Ring bzw. D-Ring.

Diastereomer mit L-Valin:

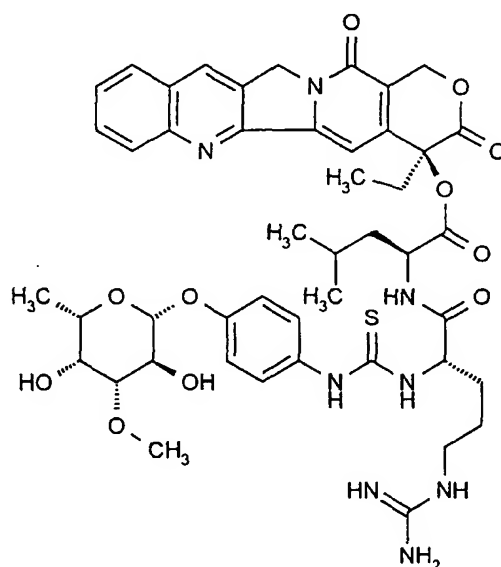
400-MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD}$  1:1):  $\delta$  s C-H (B-Ring) 8,58 ppm (überlagert von einem CH arom. von Histidin)

20 s C-H (D-Ring) 7,35 ppm

[DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R<sub>f</sub> = 0,36] [FAB-MS: m/z = 896 (M + H<sup>+</sup>)].

**Beispiel 10:**

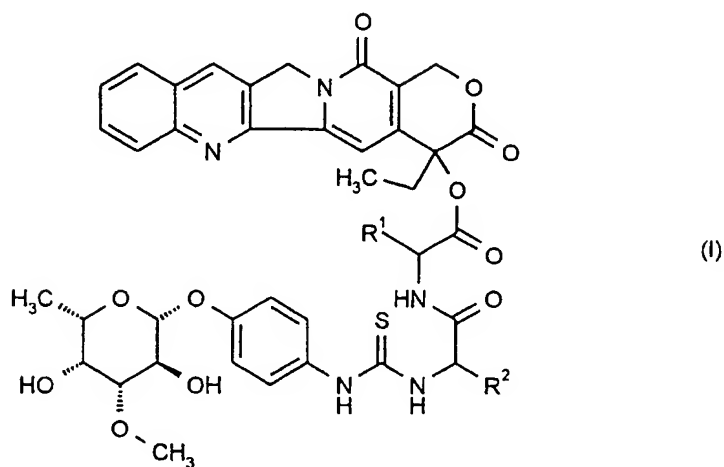
- 5     20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-arginyl-L-leucyl}-camptothecin;



- 10     Das Produkt wird in Analogie zu Beispiel 5 hergestellt. Dabei wird auf der Stufe des 20-O-Leucyl-Camptothecins II.b das unpolare Diastereomer II.b) L eingesetzt.  
 [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R<sub>f</sub> = 0,4] [FAB-MS: m/z = 929 = M+H<sup>+</sup>].  
 Mit den unter Beispiel 8 und 9 angegebenen HPLC-Bedingungen kann man die Diastereomeren aus Beispiel 5 und 10 unterscheiden.

**Patentansprüche**

1. Camptothecin-Glycokonjugate der Formel (I)



5

worin

10  $R^1$  für eine sterisch anspruchsvolle unpolare Seitenkette einer Aminosäure steht und

$R^2$  für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht

sowie deren Salze, Stereoisomere und Stereoisomerengemische.

15

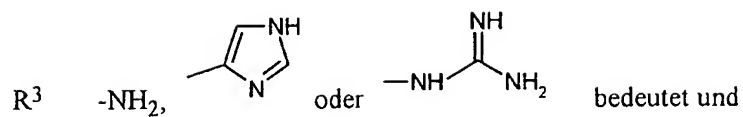
2. Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1, wobei

$R^1$  für einen verzweigten Alkylrest mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen steht und

20

$R^2$  für einen Rest der Formel  $-(CH_2)_n-R^3$  steht, wobei

- 46 -

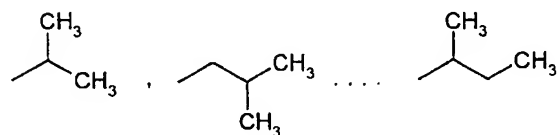


$n$  für eine Zahl 1 bis 4 steht,

5 und deren Salze, Stereoisomeren und Stereoisomerengemische.

3. Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1, wobei

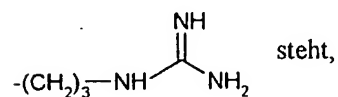
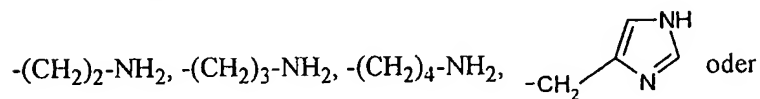
$R^1$  für einen verzweigten Alkylrest der Formeln



10

steht und

$R^2$  für einen Rest der Formeln



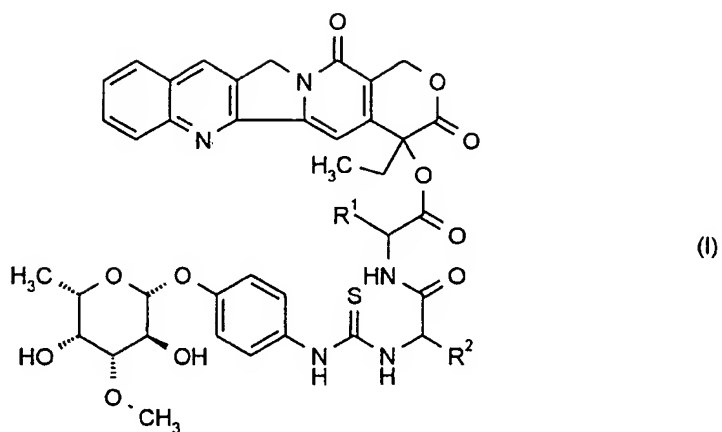
15

und deren Salze, Stereoisomeren und Stereoisomerengemisch.

4. Verfahren zur Herstellung der Glykokonjugate der Formel (I)



- 47 -

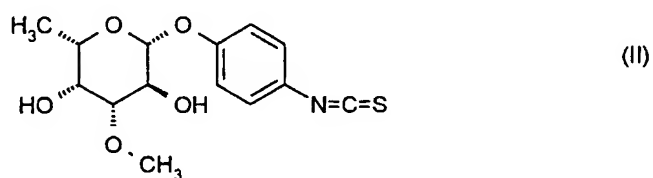


worin

5         $R^1$     für eine sterisch anspruchsvolle unpolare Seitenkette einer Aminosäure steht und

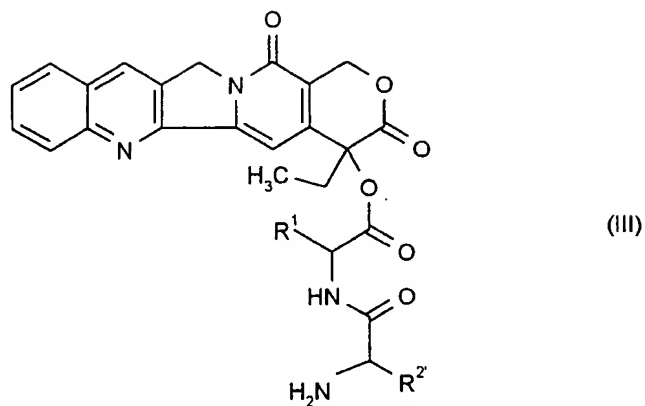
$R^2$     für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht,

10       oder von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Isothiocyanat der Formel (II)



15       mit dem gegebenenfalls in der Seitenkette eine Schutzgruppe tragenden Peptidyl-Camptothecin der Formel (III)

- 48 -



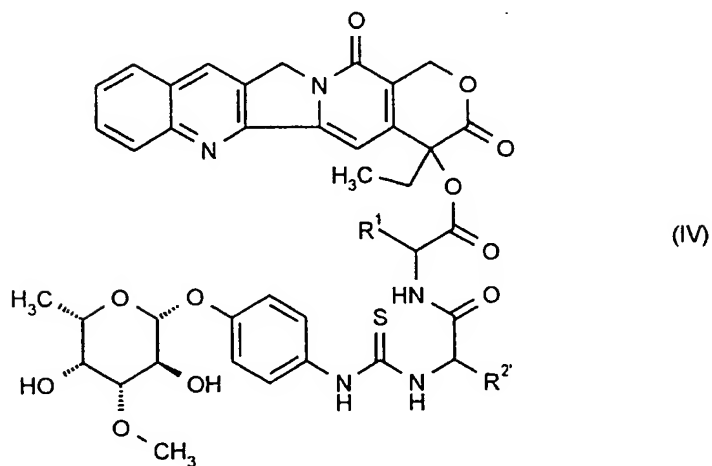
worin

5  $R^1$  die obengenannte Bedeutung hat und

$R^{2'}$  die Bedeutung des obengenannten basischen Rests  $R^2$  hat, der darüber-  
hinaus an der basischen Gruppe eine in der Peptidchemie übliche  
Schutzgruppe tragen kann

10

zu dem Glycokonjugat der Formel (IV)



- 49 -

worin

$R^1$  und  $R^{2'}$  die oben angegebenen Bedeutungen haben,

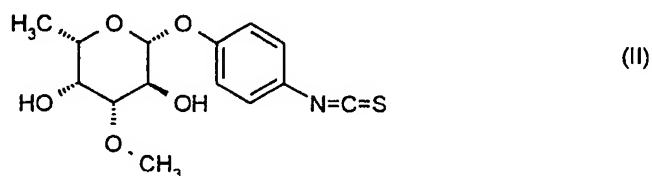
5 umgesetzt,

die gegebenenfalls vorhandene Seitenketten-Aminoschutzgruppe nach üblichen Methoden abspaltet und

10 die erhaltene Verbindung gegebenenfalls in das gewünschte Salz überführt.

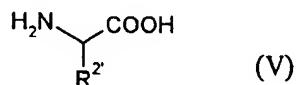
5. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder von deren Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Isothiocyanat der Formel (II)

15



mit einer gegebenenfalls geeignet geschützten terminalen basischen Aminosäure der Formel (V)

20

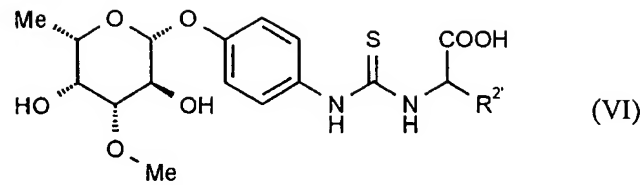


worin  $R^{2'}$  für eine basische Seitenkette einer Aminosäure steht, deren basische Gruppe geschützt sein kann,

25

zu einem Aminosäurekonjugat der Formel (VI)

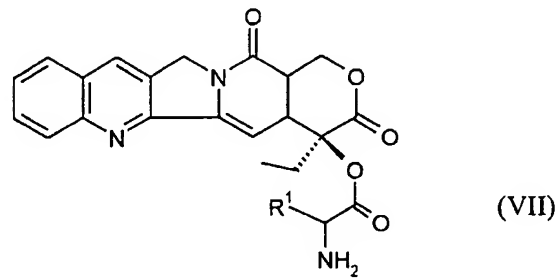
- 50 -



worin  $\text{R}^2$  die vorstehend angegebene Bedeutung hat, umsetzt,

5

diese dann mit Aminosäurekonjugaten der Formel (VII)



10

worin  $\text{R}^1$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat,

umsetzt,

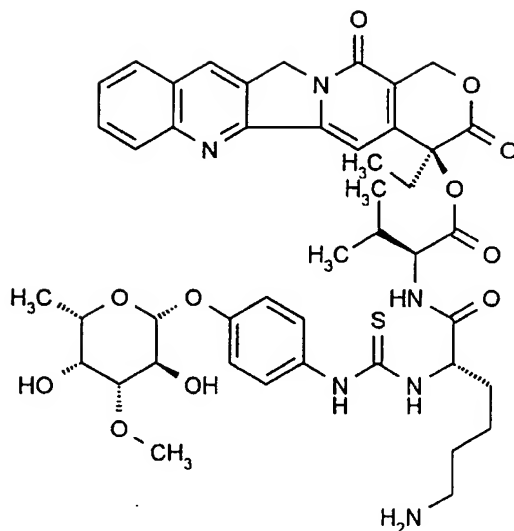
die Seitenkettenschutzgruppe gegebenenfalls abspaltet und die Verbindungen  
gegebenenfalls in ein geeignetes Salz überführt.

15

6. Verbindung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um  
20(S)-20-O-{ $\text{N}^\alpha$ -[O-(3-O-Methyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenyl]-  
amino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin der Formel

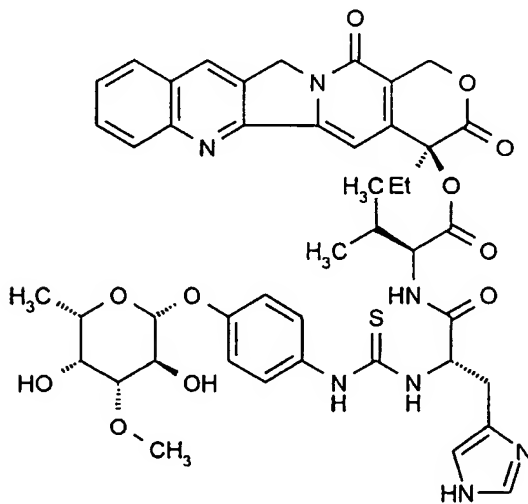
20

- 51 -



und dessen Salze handelt.

- 5      7. Verbindung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um 20(S)-20-O-{N<sup>α</sup>-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenyl-amino-thiocarbonyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin der Formel



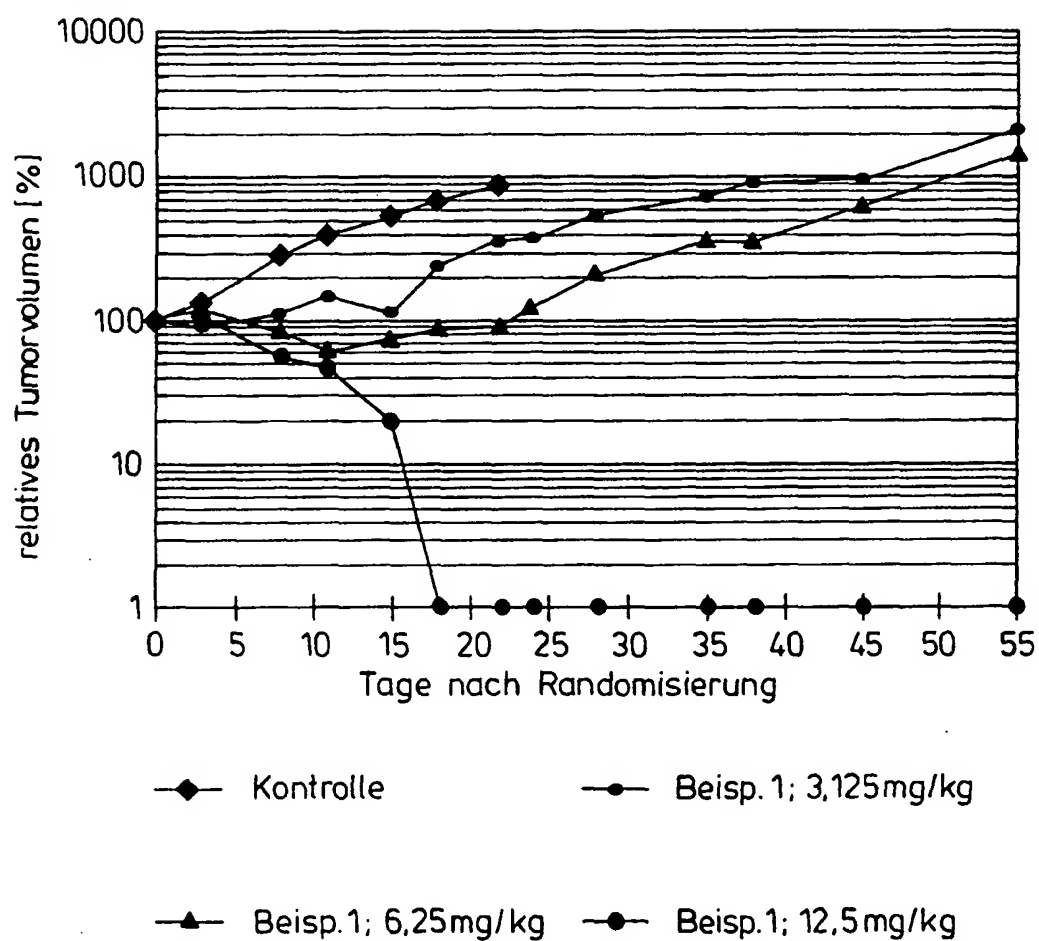
10

und dessen Salze handelt.

- 52 -

8. Verwendung von Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln.
- 5 9. Arzneimittel enthaltend Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1.

- 1 / 1 -

**Fig. 1**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International Application No

PCT/EP 98/02620

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K9/00 C07H15/203 C07D491/22 A61K38/14 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C07H C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 31532 A (BAYER AG ; LERCHEN HANS GEORG (DE); VON DEM BRUCH KARSTEN (DE); PET) 10 October 1996 cited in the application example 18, esp. 18.8 and 18.9 ---	1-6,8,9
A	EP 0 757 049 A (TANABE SEIYAKU CO) 5 February 1997 claims ---	1-9
P,X	WO 98 14459 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ; BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 9 April 1998 claims, examples ---	1-9
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 1998

Date of mailing of the international search report

02/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kronester-Frei, A



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02620

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 98 15573 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 16 April 1998 claims, examples ---	1-9
A	EP 0 501 250 A (BAYER AG) 2 September 1992 whole document -----	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/02620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631532 A	10-10-1996	DE 19512484 A	17-10-1996
		AU 5397696 A	23-10-1996
		CA 2217164 A	10-10-1996
		CN 1185786 A	24-06-1998
		CZ 9703143 A	14-01-1998
		EP 0819135 A	21-01-1998
		HU 9800513 A	29-06-1998
		NO 974564 A	25-11-1997
		PL 322681 A	16-02-1998
		SK 134597 A	06-05-1998
EP 0757049 A	05-02-1997	AU 6069896 A	06-02-1997
		BG 100758 A	28-02-1997
		BR 9603253 A	28-04-1998
		CA 2182244 A	03-02-1997
		CN 1145365 A	19-03-1997
		HU 9602122 A	28-11-1997
		JP 10072467 A	17-03-1998
		NO 963214 A	03-02-1997
WO 9814459 A	09-04-1998	DE 19643764 A	02-04-1998
		AU 4459297 A	24-04-1998
WO 9815573 A	16-04-1998	DE 19640969 A	16-04-1998
		AU 4776797 A	05-05-1998
EP 0501250 A	02-09-1992	DE 4106101 A	03-09-1992
		CA 2060746 A	27-08-1992
		CA 2061993 A	28-08-1992
		FI 920834 A	28-08-1992
		JP 5078394 A	30-03-1993

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02620

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K9/00 C07H15/203 C07D491/22 A61K38/14 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C07H C07D A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 31532 A (BAYER AG ; LERCHEN HANS GEORG (DE); VON DEM BRUCH KARSTEN (DE); PET) 10. Oktober 1996 in der Anmeldung erwähnt example 18, esp. 18.8 and 18.9 ---	1-6, 8, 9
A	EP 0 757 049 A (TANABE SEIYAKU CO) 5. Februar 1997 claims ---	1-9
P, X	WO 98 14459 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ; BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 9. April 1998 claims, examples --- -/--	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. September 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/10/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kronester-Frei, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02620

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 98 15573 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 16.April 1998 claims, examples -----	1-9
A	EP 0 501 250 A (BAYER AG) 2.September 1992 whole document -----	1-9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02620

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9631532 A	10-10-1996	DE 19512484 A	17-10-1996
		AU 5397696 A	23-10-1996
		CA 2217164 A	10-10-1996
		CN 1185786 A	24-06-1998
		CZ 9703143 A	14-01-1998
		EP 0819135 A	21-01-1998
		HU 9800513 A	29-06-1998
		NO 974564 A	25-11-1997
		PL 322681 A	16-02-1998
		SK 134597 A	06-05-1998
EP 0757049 A	05-02-1997	AU 6069896 A	06-02-1997
		BG 100758 A	28-02-1997
		BR 9603253 A	28-04-1998
		CA 2182244 A	03-02-1997
		CN 1145365 A	19-03-1997
		HU 9602122 A	28-11-1997
		JP 10072467 A	17-03-1998
		NO 963214 A	03-02-1997
WO 9814459 A	09-04-1998	DE 19643764 A	02-04-1998
		AU 4459297 A	24-04-1998
WO 9815573 A	16-04-1998	DE 19640969 A	16-04-1998
		AU 4776797 A	05-05-1998
EP 0501250 A	02-09-1992	DE 4106101 A	03-09-1992
		CA 2060746 A	27-08-1992
		CA 2061993 A	28-08-1992
		FI 920834 A	28-08-1992
		JP 5078394 A	30-03-1993

